

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-126185

(43)Date of publication of application : 16.05.1995

(51)Int.Cl.

A61K 39/39  
A61K 9/127  
A61K 39/00

(21)Application number : 05-272693

(71)Applicant : TONEN CORP  
HATANAKA SHOICHI  
MIZUOCHI TSUGIO

(22)Date of filing : 29.10.1993

(72)Inventor : SUGIMOTO MASANOBU  
OISHI KAZUE  
HATANAKA SHOICHI  
MIZUOCHI TSUGIO

(54) LIPOSOME HAVING OLIGOSACCHARIDE ON SURFACE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a liposome as an adjuvant effective for somatic cell immunity, having low toxicity and antigenicity and applicable to human.

CONSTITUTION: This liposome has an oligosaccharide composed of 2-11 sugar residues and capable of bonding to a lectin originated from an antigen presenting cell on the surface of the liposome. A vaccine is prepared by sealing an antigen in the liposome.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.07.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration] 18.09.1998

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## Document Number list

	1	2	3	4	5
Application Number	05-272693(1993)				
Unexamined Publication Number	JP,07-126185,A (1995)				
Examined Publication Number					
Registration Number	JP,2828391,B				

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-126185

(43) 公開日 平成7年(1995)5月16日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/39				
9/127	F			
	L			
39/00	G			

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願平5-272693

(22) 出願日 平成5年(1993)10月29日

(71) 出願人 390022998

東燃株式会社

東京都千代田区一ツ橋1丁目1番1号

(74) 上記1名の復代理人 弁理士 宇井 正一 (外5名)

(71) 出願人 593199895

畑中 正一

京都府京都市左京区高野東開町1-23 東

大路高野第三住宅35-203

(71) 出願人 592045290

水落 次男

愛知県名古屋市昭和区滝川町26-1-B-

110

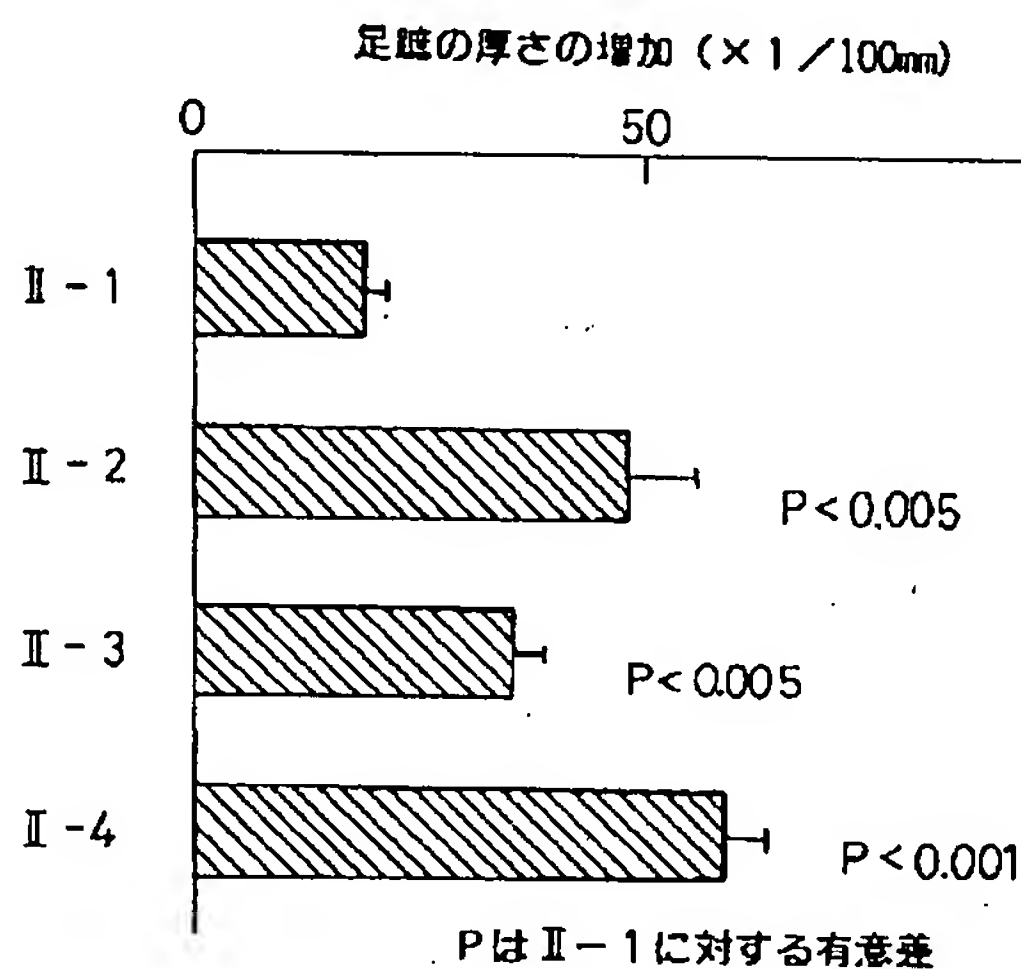
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴ糖を表面に有するリポソーム

(57) 【要約】

【目的】 体細胞免疫に効果的であり、且つ毒性及び抗原性が低くヒトに投与することができるアジュバントとしてのリポソームを提供する。

【構成】 2～11個の糖残基から成り、抗原提示細胞由来のレクチンに結合することができるオリゴ糖を表面に有するリポソーム；及び該リポソームに抗原を封入して成るワクチン。



(2)

特開平7-126185

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 2～11個の糖残基から成り抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有するリポソーム。

【請求項2】 請求項1に記載のリポソームに抗原を封入して成るワクチン。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は細胞性免疫を効率良く誘導できるリポソーム製剤の製造方法に関するもので、このリポソームはワクチンや免疫療法剤のアジュバント（免疫促進補助剤）として広く使用できる。

## 【0002】

【従来の技術】 ワクチンや免疫療法剤では、抗原単独では一般に有効な免疫反応がでないために、アジュバントが免疫原性を高めるための補助剤として使用される。研究の上では、多数のアジュバント作用をもつ物質や製剤が報告されているが、毒性が強いといった理由によりほとんどのものが実用化されておらず、磷酸化アルミニウムアジュバントあるいは水酸化アルミニウムを主成分とするアラムアジュバントがヒトに適用されている唯一のものである。

【0003】 これに代る方法として、特開平2-188532には、抗原提示糖蛋白質をリポソームに再構成したりリポソームワクチンが記載されている。免疫は液性免疫と細胞性免疫に大別され、アラムは液性免疫を比較的効率良く誘導できるが、細胞性免疫誘導に関してはあまり有効ではない。しかし、最近エイズを初めとする持続感染型のウイルス性疾患では、細胞性免疫の役割が重要であることが次第に明らかになってきた（J. Salk et al., Science 260, 1270-1271, 1993 ; M. Sugimoto, K. Ohishi and Y. Ikawa, Immunol. Today 14, 190-191, 1993）。

【0004】 したがって、強い細胞性免疫を誘導できるアジュバントの開発の必要性がでてきた。マンナンのような高分子多糖体にて被覆したりリポソームには、強い細胞性免疫誘導能のあることが報告されている（Y. Noguchi et al., J. Immunol., 143, 3737-3742, 1989）。また、WO92/04887には、マンノースを含む多糖類で被覆されたりリポソームが記載されている。しかし、マンナンは異なる大きさのポリマンノースの混合物であり、また、生体に強い毒性を示すことが知られており（三上健 他、第15回糖質シンポジウム抄録、43-44、平成5年7月29、30日、仙台）医薬品としては不向きである。

【0005】 すなわち、マンナンはマンノース残基が50～100個よりなる大きな多糖体で、分子量の点でも不均一であり、また糖の結合様式など構造的にも未知である。この多糖体は、動物に接種すると抗体を産生し（抗原性を有する）、また、上述したように強い毒性のあることも知られている。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明は、細胞性免疫の誘導のために有効なアジュバント活性を有し、且つ毒性及び抗原性が低くて、ヒトに対して使用することができるリポソームを提供しようとするものである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、2～11個の糖残基から成り抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有するリポソームが、細胞性免疫の誘導のために有効なアジュバント活性を有し、しかも毒性及び抗原性が低く、ヒトに対して使用することができることを見出した。

【0008】 従って、本発明は、2～11個の糖残基から成り抗原提示細胞由来のレクチンに結合するオリゴ糖を表面に有するリポソームを提供する。本発明はまた、上記のリポソーム中に抗原を封入して成るワクチンを提供する。

## 【0009】

【作用及び効果】 本発明のリポソームは細胞性免疫の誘導のためのアジュバント活性を有し、且つ毒性及びそれ自体の抗原性が低いので、ヒトに対して、ワクチン等の抗原のアジュバントとして使用することができる。特に該リポソームに目的とする抗原又は免疫原を封入した場合、強力なワクチンが得られる。

## 【0010】

【具体的な説明】 本発明のリポソームは、その表面に、抗原提示細胞由来のレクチンに結合することができ、且つ2～11個の糖残基から成るオリゴ糖を有している。ここで、抗原提示細胞として、マクロファージ、デンドリティック細胞等を意味する。また、抗原提示細胞由来のレクチンとは、上記のごとき抗原提示細胞の表面に存在するマンノース・レセプター等を意味する。

【0011】 前記オリゴ糖を構成する単糖としては、それ自体が、抗原提示細胞のレクチンに結合する性質を有するものが好ましく、例えばマクロファージのマンノース・レセプターが認識する糖をその認識の強さの順に挙げれば、D-マンノース（D-Man）、L-フコース（L-Fuc）＞D-アセチルグルコサミン（D-GlcNAc）、D-グルコース（D-Glc）＞D-ガラクトース（D-Gal）、D-アセチルガラクトサミン（D-GalNAc）、D-ラムノース（D-Lam）である（B.L. Largent et al., J. Biol. Chem. 259, 1764-1769, 1984）。しかしながら、オリゴ糖は、それ自体として抗原提示細胞のレクチンに結合できればよく、その構成糖として抗原提示細胞のレクチンに結合しないものを含んでいてもよい。

【0012】 オリゴ糖中で、各構成糖は、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合又は $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合等あるいはこれらの組合せにより結合してい

(3)

特開平7-126185

3

4

る。例えば、マンノースは上記の結合により単鎖を構成してもよく、又は $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合との組合せにより分枝構造をとってもよい。オリゴ糖中の単糖の数は、好ましくは2～11個である。具体的なオリゴ糖として、例えばマンノピオース (Man 2)、マンノトリオース (Man 3)、マンノテトラオース (Man 4)、マンノペンタオース (Man 5)、マンノヘキサオース (Man 6)、マンノヘプタオース (Man 7)、種々の混合オリゴ糖、例えば下記に示すM5 (化1) 及びRN (化2) 等を挙げることができる。

【0013】

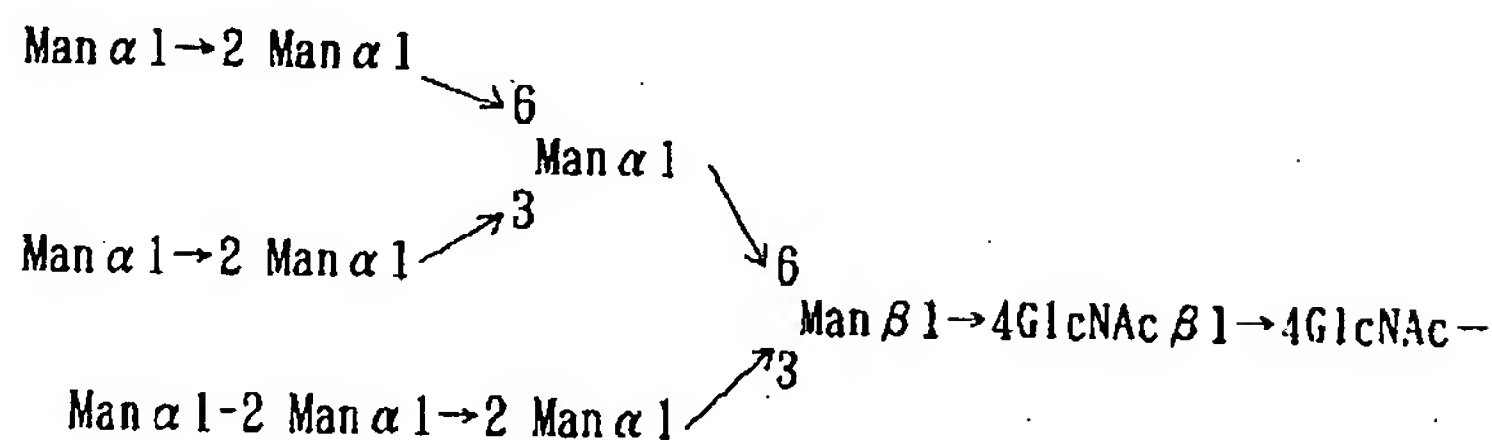
【化1】

10 【0014】

【化2】

\*

RN



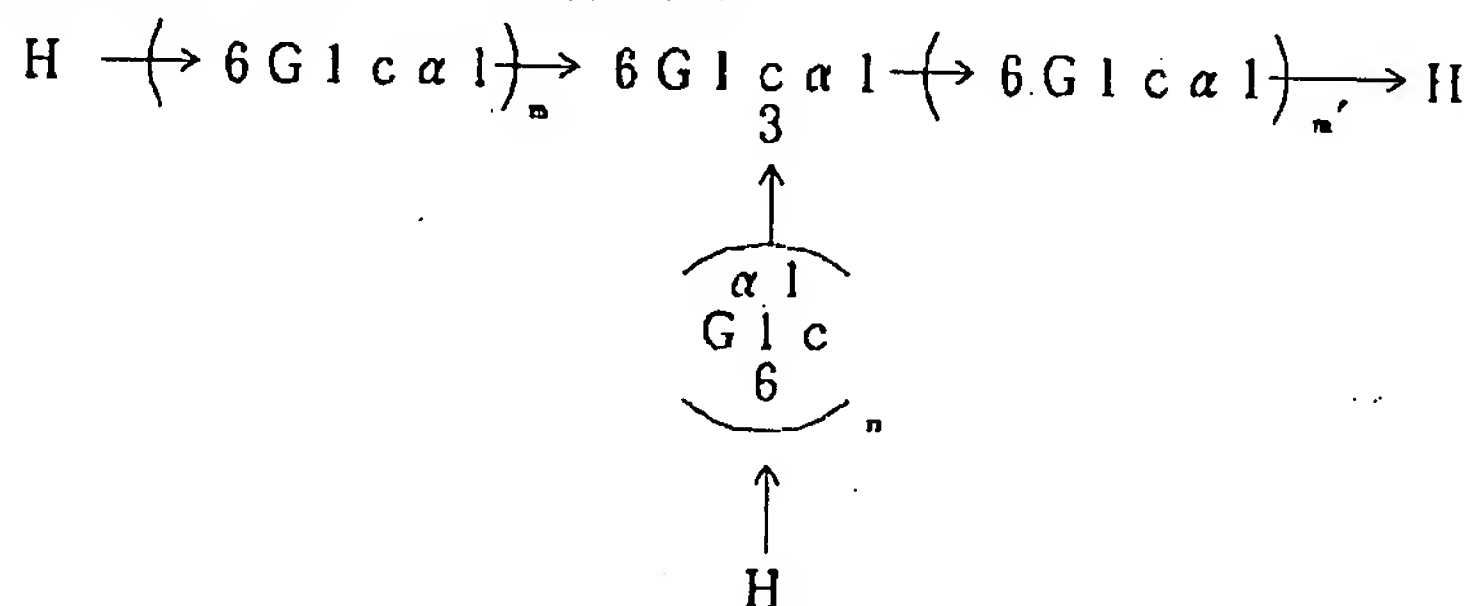
(式中、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合しているManは、それぞれ独立に、存在してもよく存在しなくてもよい。)

【0015】さらに、グルコースを含有するオリゴ糖として化3に示す構造を有するものを挙げることができ、N-アセチルグルコサミンを含むオリゴ糖として化4に示すものを挙げることができ、そしてフコースを含むオ※

※リゴ糖として化5に示すものを挙げることができる。

【0016】

【化3】



(m+m' + nは1～10)

【0017】

【化4】

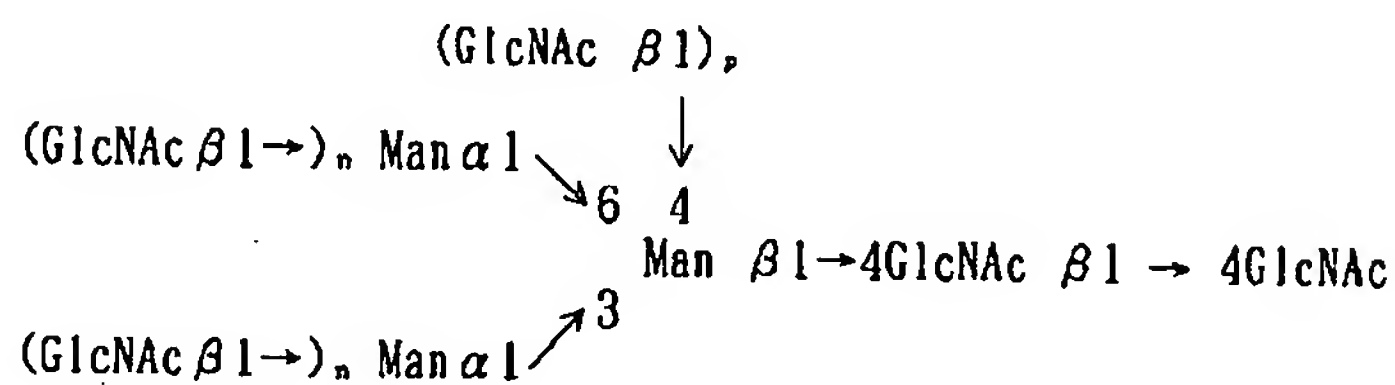
(4)

特開平7-126185

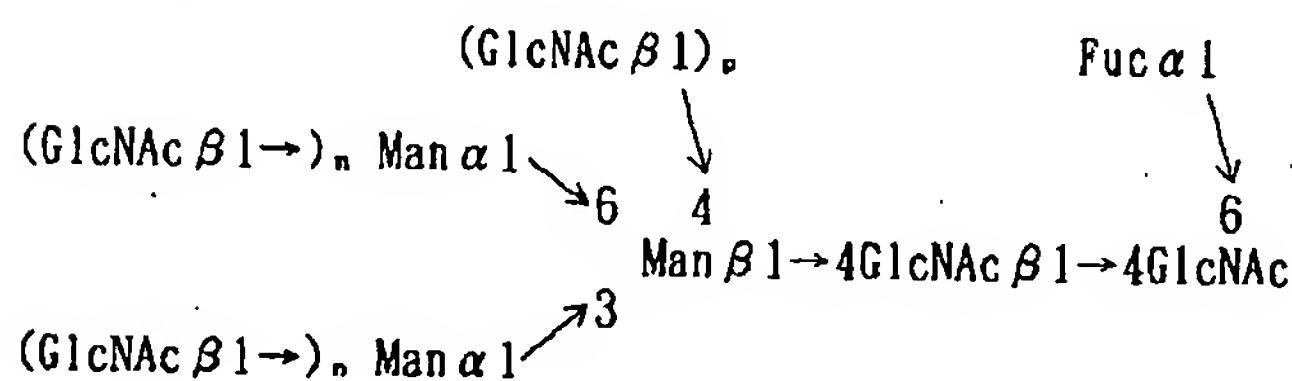


6

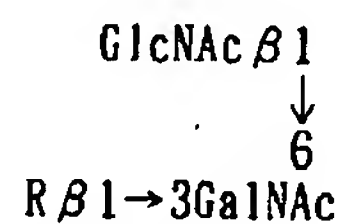
(nは0~4)



(pは0又は1であり、nはそれぞれ独立に0~3である。式中右側の4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAcで示した2つのGlcNAc残基は、それぞれ独立にあってもなくてもよい。また、(GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ )<sub>n</sub>で示したGlcNAcはどれも右隣のManの空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



(pは0又は1であり、nはそれぞれ独立に0~3である。また、(GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ )<sub>n</sub>で示したGlcNAcはどれも右隣のManの空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



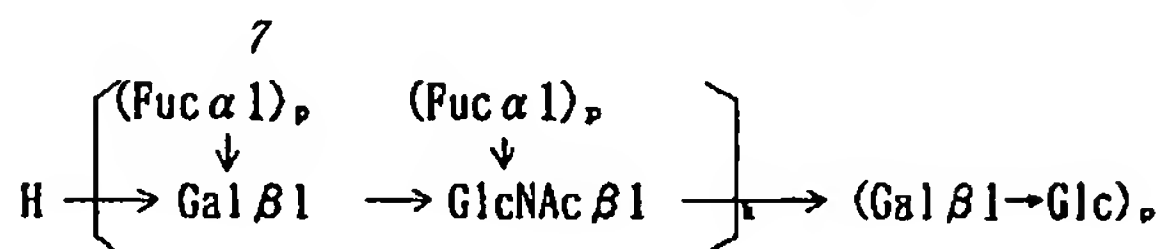
RはH、GlcNAc、又は(GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)<sub>p</sub>、(GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)<sub>p</sub>Gal  
(pは0又は1である。)

【0018】

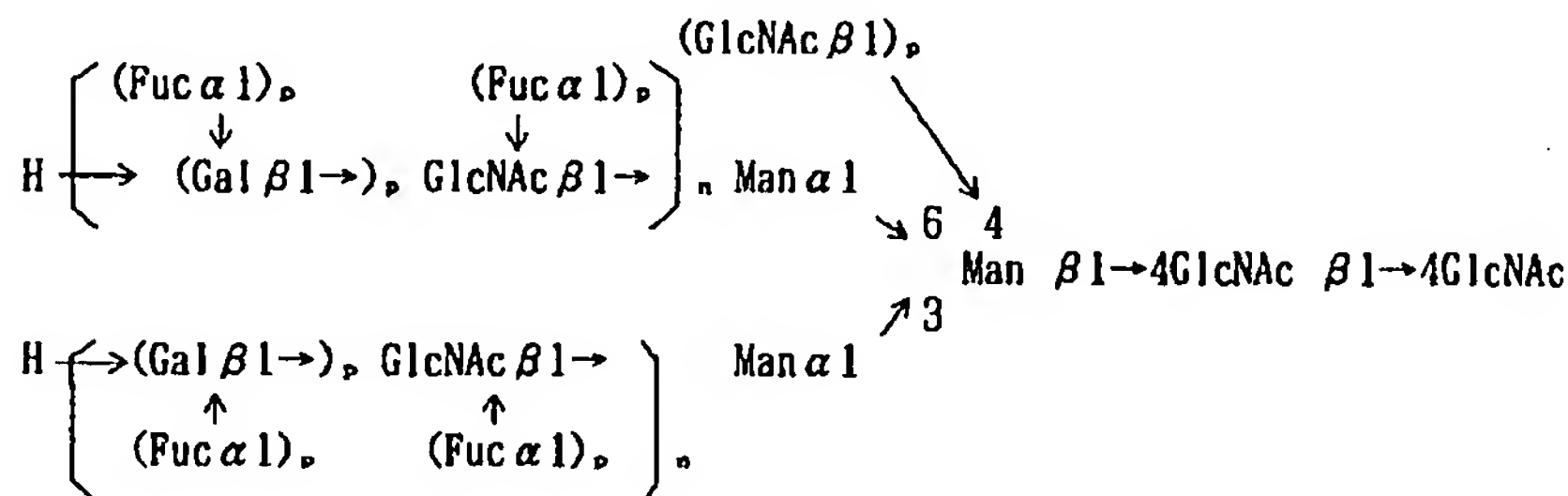
【化5】

(5)

特開平7-126185

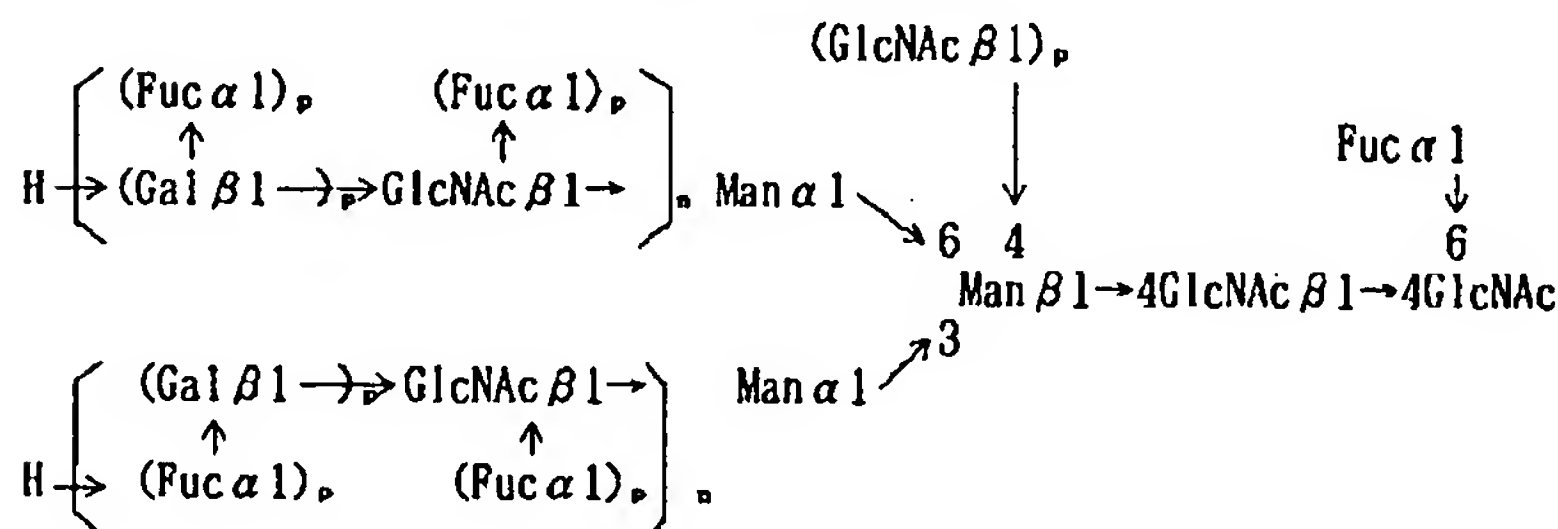


(kは1～5であり、pはそれぞれ独立に0又は1である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。)

矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4GlcNAc  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。)

矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4GlcNAc  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

【0019】上記のオリゴ糖は、いずれも1個の還元末端アルデヒド基を有する。そこで、このアルデヒド基を、オリゴ糖をリポソーム表面に導入するための手段として使用することができる。すなわち、このアルデヒドと、アミノ基を有する脂質との間に反応により Schiff 塩基を形成し、次にこの Schiff 塩基を、常法に従って、還元、好ましくは化学還元、例えば  $\text{N}_2\text{BH}_3\text{CN}$  により還元することにより、オリゴ糖と、脂質とを結合することができる(水落次男、糖質工学、224-232頁、産業調査会バイオテクノロジー情報センター、1992)。

【0020】上記のアミノ基を有する脂質は、好ましく

はアミノ基を有するリン脂質であり、例えばホスファチジルアミン、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン(DSPE)等を使用することができる。上記のようにして得られた、オリゴ糖と脂質との結合物を、本発明においては人工糖脂質と称する場合がある。

【0021】リポソームを構成する脂質としては、リポソームを構成するために知られている任意の常用の脂質を単独で又は複数組合わせて使用することができる。例えば、天然物、例えば卵黄、大豆、又はその他の動植物から得られる脂質、これらの脂質を修飾したもの、例え

9

ば水素添加によって不飽和度を低下したもの、あるいは化学合成したものを使用することができる。具体的には、例えば、ステロール類、例えばコレステロール (Chol) ; ホスファチジルエタノールアミン類、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) ; ホスファチジルコリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC) ; ホスファチジルセリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルセリン (DPPS)、ジステアロイルホスファチジルセリン (DSPS) ; ホスファチジン酸類、例えばジパルミトイルホスファチジン酸 (DPPA)、ジステアロイルホスファチジン酸 (DSPA)、等が挙げられる。

【0022】リボソームの作製自身は公知の方法を用いる [D. W. Deamer, P. S. Uster, "Liposome" ed. by M. J. Osorio, Marcel Dekker Inc., N.Y. Basel, 1983, p27]。ボルテックス法および超音波法が一般的であるが、そのほかにエタノール注入法、エーテル法および逆相蒸発法などが適用でき、これらを組合せて使用することもできる。

【0023】例えば、ボルテックス法および超音波法においては、所定の脂質を有機溶剤、例えばメタノール、エタノール、クロロホルム又はこれらの混合物、例えばメタノールとクロロホルムとの混合物に溶解した後、該有機溶剤を蒸発除去することにより脂質の薄層を得る。次に、この脂質の薄層に水性媒体を加えてボルテックス処理又は超音波処理することによりリボソームが形成される。この際に、上記水性媒体にワクチン等の活性成分である所望の抗原又は免疫原を混入、例えば溶解又は懸濁させておくことにより、該抗原又は免疫原をリボソームに封入することができる。

【0024】オリゴ糖をリボソームの表面に導入するためには、例えば、次の2つの方法のいずれかを用いればよい。前記の人工糖脂質が水溶性で有機溶剤に十分溶解しない場合、例えば、前記のM5とDPPEとの結合物 (M5-DPPE)、RNとDPPEとの結合物 (RN-DPPE) を用いる場合には、これらの水性溶液を調製し、これを形成されたリボソームと混合して、例えば4℃ないし室温において24~120時間、例えば約72時間インキュベーションすればよい。

【0025】他方、人工糖脂質が有機溶剤に溶解する場合には、該人工糖脂質を、リボソーム構成用脂質と共に、リボソーム製造過程において前記のごとき有機溶剤に溶解し、以後、常法に従ってリボソームを形成すればよい。リボソームの量に対するオリゴ糖の量はオリゴ糖の種類、封入しようとする抗原の種類、リボソームの組合せ構造等により異なるが、一般に、リボソームを構成する脂質1mgに対して5μg~500μgである。

【0026】本発明のリボソームは、多重層タイプ (mu

(6)

特開平7-126185

10

ltilamella vesicle) であってもよく、また単層タイプ (unilamella vesicle) であってもよい。これらは既知の常法に従って調製することができ、また常法に従って一方のタイプを他方のタイプに、例えば多重層タイプのリボソームを単層タイプのリボソームに転換することもできる。本発明のリボソームの粒径は特に限定されないが、必要により常法に従って、例えば所望の孔サイズのフィルターにより濾過することにより、粒径を整えることができる。

【0027】本発明のリボソームに封入する抗原としては、水溶性のあらゆる抗原を用いることができる。このような抗原として、例えば蛋白質又はペプチド抗原、特に合成蛋白質又はペプチド抗原、例えば分離源からの抽出により、遺伝子組換えにより、あるいは化学合成により製造された蛋白質、糖蛋白質、ペプチドおよび糖ペプチドが使用される。これらの抗原として、例えばヒト免疫不全症ウイルス (HIV)、インフルエンザウイルス、マラリア原虫、結核菌などの外被タンパク質やコアタンパク質あるいはその一部のペプチドなどが挙げられる。

【0028】リボソームの量に対する抗原の量は、非常に重要であり、抗原の種類やリボソームの組成や構造等により異なるが、一般にリボソームを構成する脂質1mg当たり1μg~100μgである。オリゴ糖が表面に結合していることは、次のようにして証明される。すなわち、糖に該当するレクチンを添加してリボソームの凝集反応で調べる。

【0029】糖の効果を評価するためには、モデル抗原を封入したリボソームを使用するが、抗原としては卵白アルブミン (OVA) のように実験例も多く、抗原性の高い標準的なタンパク質が好ましい。細胞性免疫の指標としてはマウスでの遅延型アレルギー (DTH) 反応 (T<sub>H</sub> 1細胞が担当) を採用することができる。目的とするアジュバントは、実験例に示すようにDTH反応を誘導することができる。したがって、T<sub>H</sub> 1細胞が関与するような病原体の感染防御ワクチン、その免疫療法剤、あるいは癌免疫療法剤のアジュバントとして使用できるであろう。

【0030】

【実施例】次に、実施例及び実験例により、本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1. 人工糖脂質の調製

α1→3結合したマンノピオース (Man2)、Man α1→6 (Man α1→3) Manという構造を有するマンノトリオース (Man3)、M5 (化1に示した化合物)、及びRN (化2に示した化合物) 2.5~5mgに600μlの蒸留水を加えて攪拌溶解してオリゴ糖溶液を調製した。

【0031】他方、クロロホルム/メタノール (1:1体積比) 混合液にDPPEを5mg/mlの濃度で溶解して

(7)

特開平7-126185

11

D P P E 溶液を調製した。また、メタノールに、N, B H<sub>2</sub> C N を 1 0 m g / m l の濃度に溶解して N, B H<sub>2</sub> C N 溶液を調製した。前記オリゴ糖溶液 6 0 0 μ l に前記 D P P E 溶液 9. 4 m l 及び前記 N, B H<sub>2</sub> C N 溶液 1 m l を加えて攪拌混合した。この反応混合液を 6 0 ° C にて 1 6 時間インキュベートし、人工糖脂質を生成せしめた。この反応混合液をシリカゲルカラム及び C 1 8 逆相カラムにより精製することにより人工糖脂質を得た。尚、マンナンコレステロール（同仁化学）は市販品を使用した。

【0032】実施例2. 抗原封入リボソームの調製

1 0 m M の D P P C のクロロホルム・メタノール（2 : 1, V / V）溶液（以下、C / M 溶液と略す）と 1 0 m M のコレステロール（C h o l）の C / M 溶液を 2 : 1

（通常合計 3 m l）の割合に混ぜて、2 5 m l の梨型フラスコに取り、エバポレーターに梨型フラスコを接続させ、4 0 ° C で減圧下、C / M 溶液を蒸発除去した。なおこの際に、リボソーム表面に付加すべきオリゴ糖がマンノビオース（M a n 2）又はマンノトリオース（M a n 3）の場合には、これから調製した人工糖脂質および比較のための D P P E をクロロホルムに溶解し、D P P C に対して 1 / 1 0 モルの比率で加えた。

【0033】フラスコの底に薄い脂質膜ができるが、これにクロロホルムを加えて膜を一旦溶かした後に、再度溶媒を蒸発除去した。この操作をさらに 2 ~ 3 回繰り返すと、きれいな脂質の薄膜ができた。デシケーターにフラスコを 1 時間以上入れて完全に溶媒を除き、蒸留水を加え、v o r t e x をかけて水和した。内容物を試験管に移し、- 8 0 ° C で 2 0 分間予備冷却凍結した後、凍結乾燥機にかけて水分を除いた。

【0034】モデル抗原として卵白アルブミン（O V A）の水溶液（通常 1 0 m g / m l）を加えてボルテックスをかけて水和し、O V A を封入したリボソームを形成し

12

た。このリボソーム懸濁液に P B S （リン酸緩衝液）を加え、1 5, 0 0 0 r p m にて遠心して、上清を除いた。この操作をもう一度繰り返した後に、沈殿物を目的のリボソームとして用いた。これは multilamella vesicle （多重層）タイプのリボソームである。

【0035】リボソームの表面に付加すべきオリゴ糖が M 5 又は R N、あるいはマンナン（比較例）の場合には、これらから調製した人工糖脂質を 2 ~ 1 0 m g / m l の濃度に P B S に溶解し、この溶液と上に調製したリボソームとを 5 : 1 の体積比で混合し、この混合物を室温で 3 日間インキュベートすることにより、オリゴ糖をリボソーム表面に吸着させた。未吸着の糖を測定することにより被覆された糖脂質の量を求めた。なお全てのリボソームの修飾は糖脂質で行ったが、簡便のため“M S”あるいは“マンナン”という具合に糖のみで記述してある。

【0036】出来上がったリボソームに含まれる、O V A、C h o l および各種糖の定量は次のように行った。O V A は界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム（S D S）を用いてリボソームを溶かした後に、S D S - P A G E 電気泳動にて分離し、クーマシー・ブリリアント・ブルー（C B B）にて染色した。染色の程度をデンストメトリーで数値化し、標準検体の O V A と比較することで蛋白質を算出した。C h o l は、コレステロールオキシダーゼ・p - クロロフェノール法による臨床診断用キット（和光純薬工業株式会社）を用いて定量した。糖含量はアンスロン-硫酸法にて定量した。

【0037】以上のような操作により、表 1 に示するような O V A、C h o l、および糖脂質含有（マウス 1 匹の投与量当たり）のリボソームを作製した。

【0038】

【表 1】

(8) 特開平7-126185

13		14		
実験	リボソーム	OVA(μg)	Chol(μg)	糖脂質(μg)
I	1	5.0	80.2	0
	2	5.0	80.2	166.7(M5)
	3	5.0	80.2	237.5(Mn)
II	1	12.3	70	0
	2	12.3	70	185.8(M5)
	3	12.3	70	3.1(RN)
	4	12.3	70	68.0(Mn)
III	1	6.0	60	DPPE
	2	5.5	60	Man2-DPPE
	3	10.3	60	Man3-DPPE

注 (1) 数値(μg)はマウス1匹当りの量を示す。  
(2) 実験IIIにおける糖脂質の量はDPPEに対して  
1/10のモル比である。

【0039】 実験 マウスにおける遅延型アレルギー (DTH) 反応誘導実験

一群5匹のBalb/cマウス(雌、6週令)に、上記のリボソームを接種し、その細胞性免疫誘導能をDTH反応で評価した。上記の各種リボソームを、0.2mlのPBSに懸濁し、その0.1mlづつを後背部二箇所皮に皮下接種した。接種後一週間後に、左の足趾にアラムアジュバントにまぜたOVA40μg/アラム22μg/25μl PBSを右の足趾に、アラム22μg/25μl PBSを左の足趾に对照として皮下注射し、その24時間後に、左右の足趾の厚さを測定した。右足の厚さから左足の厚さを差し引いたものを、特異的なDTH反応とした。

【0040】 図1に実験Iの結果を示す。M5で被覆したリボソームは被覆しないものに比較して統計的に有意に強いDTH反応を誘導した。Mnにも同様の促進効果があり、その程度はほぼM5と同じであった。すなわち、M5とMnのグループの間には統計的な有意差はなかった。図2に実験IIの結果を示す。やはりM5あるいはMnで被覆したリボソームは糖で被覆しないリボソームに比べ有意に高いDTH反応を誘導した。また、RNにも弱いながら統計的に有意なDTH反応の増強効果があった。しかし、M5とMnの間にはやはり有意差はなかった。

【0041】 以上の二つの実験を総合すると、被覆したリボソームのDTH反応誘導効果で見ると、M5はMnにほぼ匹敵する効果を有していることが分かった。

図3に実験IIIの結果を示す。OVAを封入したDPPEを含むリボソーム(対照)と、DPPEの代わりに各種オリゴ糖とDPPEの結合体を含むリボソームの活性をしらべた。そのなかでマンノビオース(Man2)とマンノトリオース(Man3)の群のみ統計的に有意に強いDTH反応を誘導した。

【0042】 なお、マンノース、ラクトース又はガラクトースとDPPEの結合体には有意な活性は認められなかった(データは示さず)。以上の結果から、少なくとも2~8の糖残基よりなるオリゴマンノース等のオリゴ糖とDPPEの結合体には、リボソームに添加ないしリボソームを被覆することで、リボソームによるDTH反応誘導能を促進する効果のあることが分かった。また、マンナンにも同様の効果のあることから、オリゴマンノースの長さは、これ以上長くても効果のあることが分かる。

【0043】 図4に、実験IVの結果を示す。対照として従来使用されているアラムアジュバントの効果との比較を示す。アジュバントとしてマンナン被覆リボソームを使用し抗原を使用しなかった対照(IV-1)、抗原としてのOVAを食塩水(IV-2)、常用のアラムアジュバント(IV-3)、糖を被覆してないリボソーム(IV-4)又はマンナン被覆リボソーム(IV-5)と共に投与した。マウス1匹当たり、OVAは12.5μg、アラムは15μg、リボソームはコレステロール量として40μgを使用した。

【0044】 その結果、この実験では、OVAを食塩

(9)

特開平7-126185

15

水、アラムアジュバント又はマンナンを被覆していないリボソームで接種した群の間には、まったく差は認められなかった。むしろアラムアジュバントの接種群はDTH誘導能において、この3群の中では最も低い傾向を示した。そしてマンナンを被覆したリボソームで接種した群が一番高い免疫原性を示した。この群のDTH反応はアラムアジュバントの群のものに比較し統計的に有意に高かった ( $p < 0.05$ )。

【0045】以上、図1～4の結果を総合すると、マンナンないしオリゴマンノースなどのオリゴ糖によって被

10

16

覆されたりリボソームは、アラムアジュバントに比較してDTHの誘導能において優れていることが結論される。

【図面の簡単な説明】

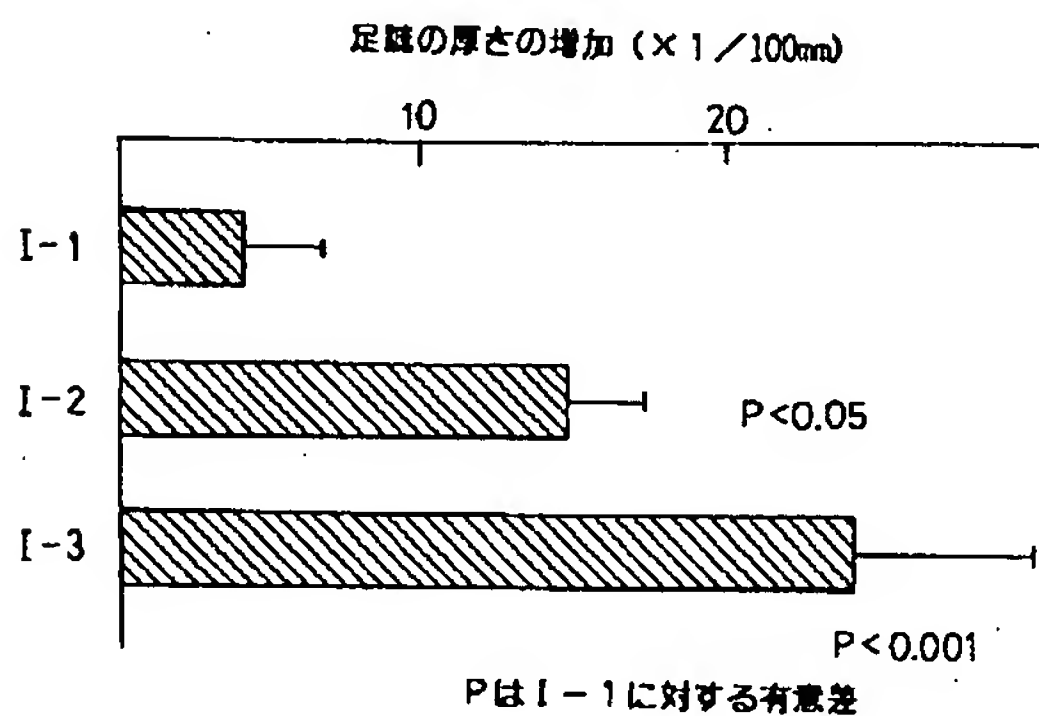
【図1】 図1は実験Iの結果を示すグラフである。

【図2】 図2は実験IIの結果を示すグラフである。

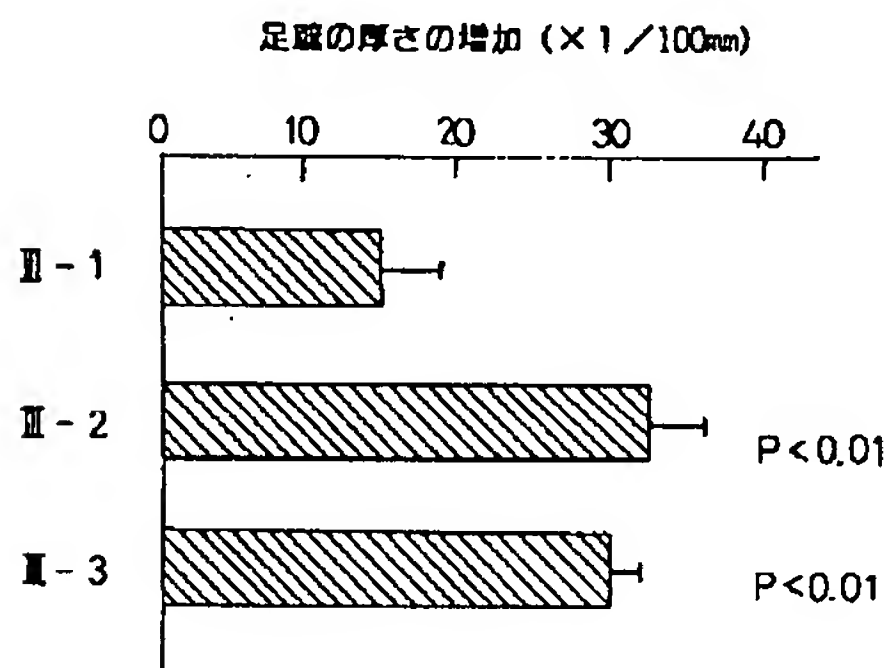
【図3】 図3は実験IIIの結果を示すグラフである。

【図4】 図4は実験IVの結果を示すグラフである。図中、斜線の棒は平均値を示し、1本線は平均誤差を示す。

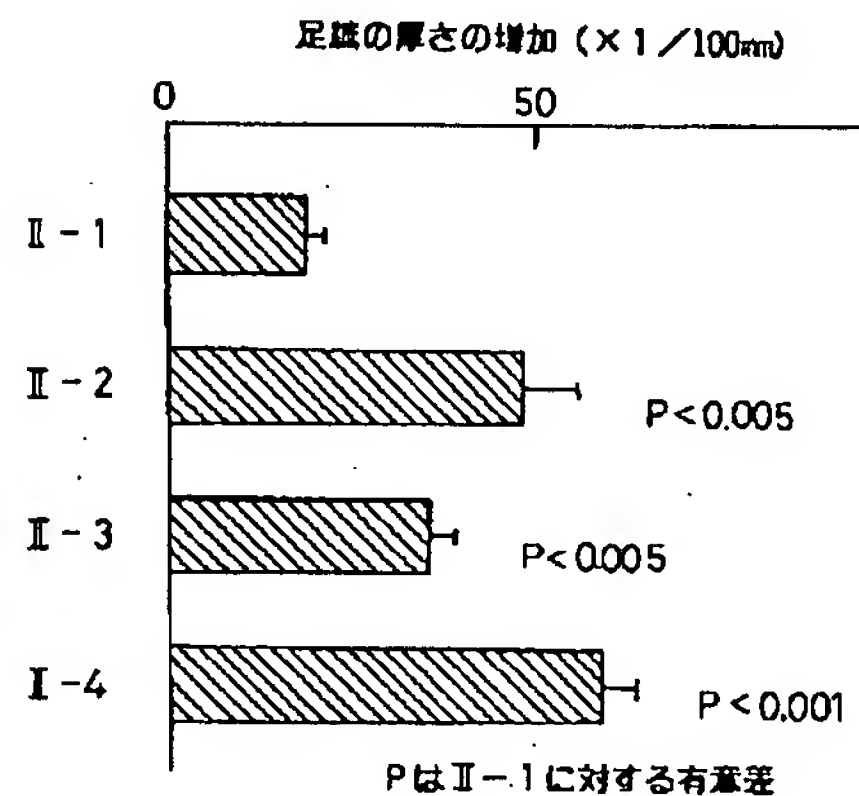
【図1】



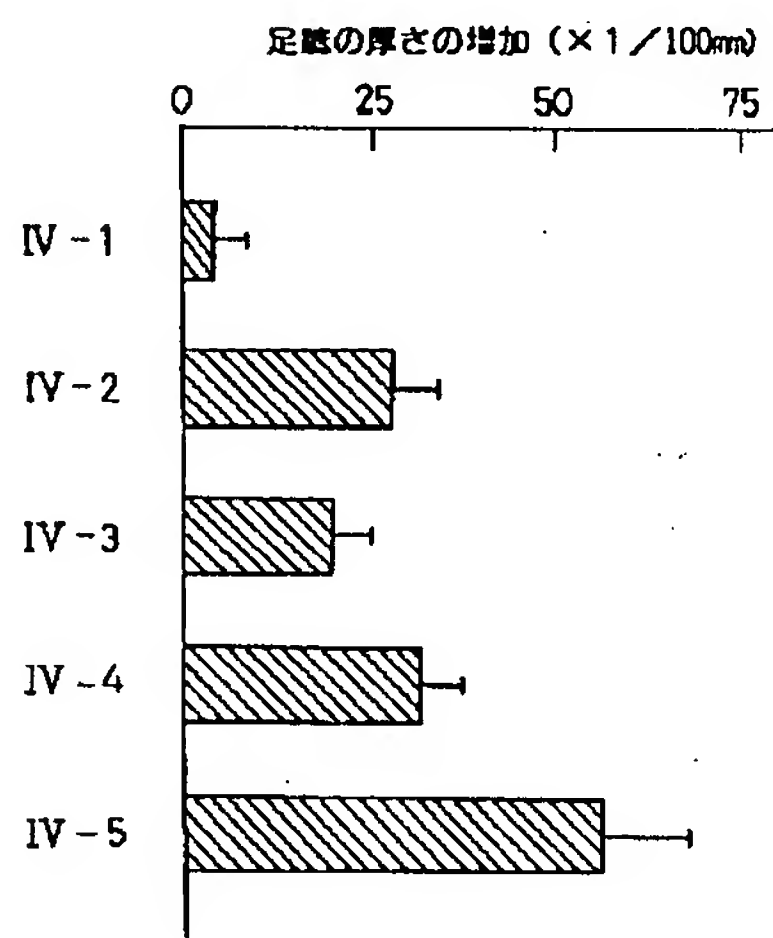
【図3】



【図2】



【図4】





(11)

特開平7-126185

## 【手続補正書】

【提出日】平成6年11月15日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

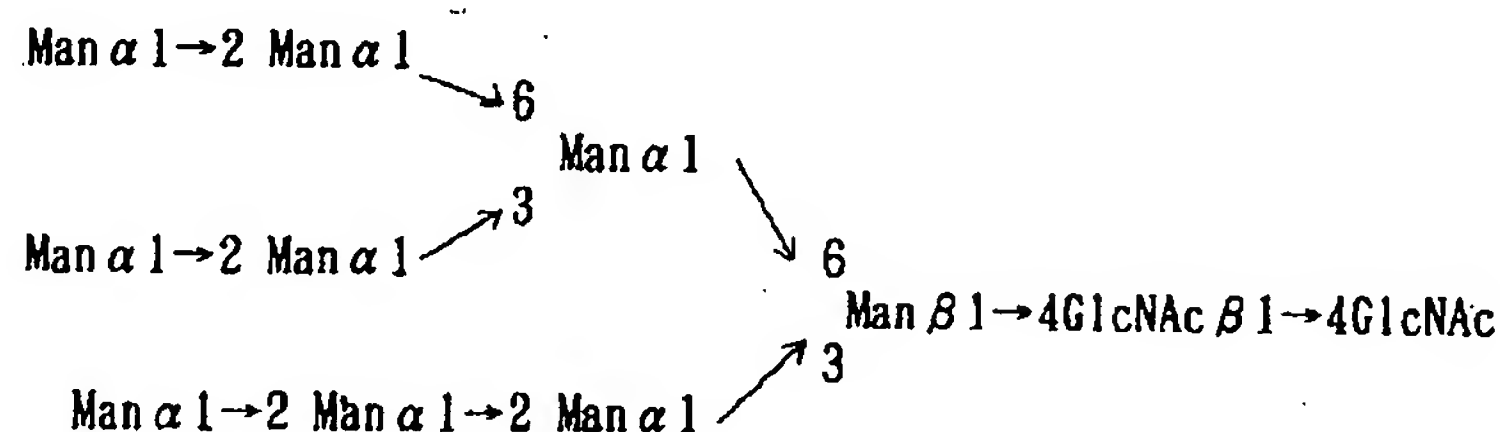
【0011】前記オリゴ糖を構成する単糖としては、それ自体が、抗原提示細胞のレクチンに結合する性質を有するものが好ましく、例えばマクロファージのマンノース・レセプターが認識する糖をその認識の強さの順に挙げれば、D-マンノース (D-Man)、L-フコース (L-Fuc) > D-アセチルグルコサミン (D-GlcNAc)、D-グルコース (D-Glc) > D-ガラクトース (D-Gal)、D-アセチルガラクトサミン (D-GalNAc)、D-ラムノース (D-Rha) である (B.L.Largent et al., J. Biol. Chem. 259, 1764-1769, 1984)。しかしながら、オリゴ糖は、それ自体として抗原提示細胞のレクチンに結合できればよく、その構成糖として抗原提示細胞のレクチンに結合しないものを含んでいてもよい。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

RN

\*



(式中、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合しているManは、それぞれ独立に、存在してもよく存在しなくてもよい。)

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

\* 【補正対象項目名】0013

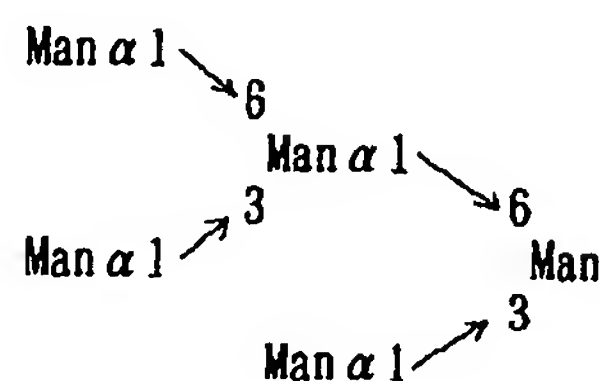
【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】

【化1】

M5



## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正内容】

【0014】

【化2】

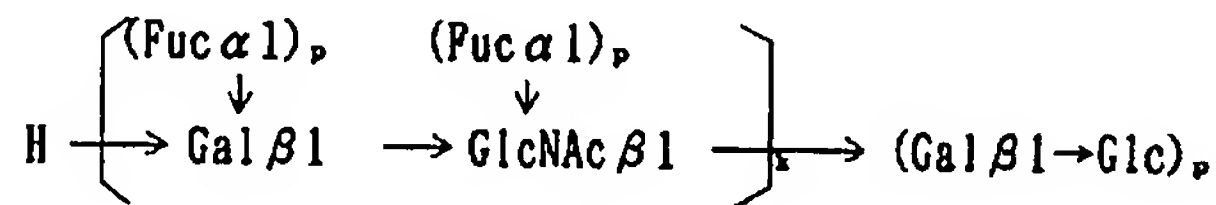
【補正内容】

【0018】

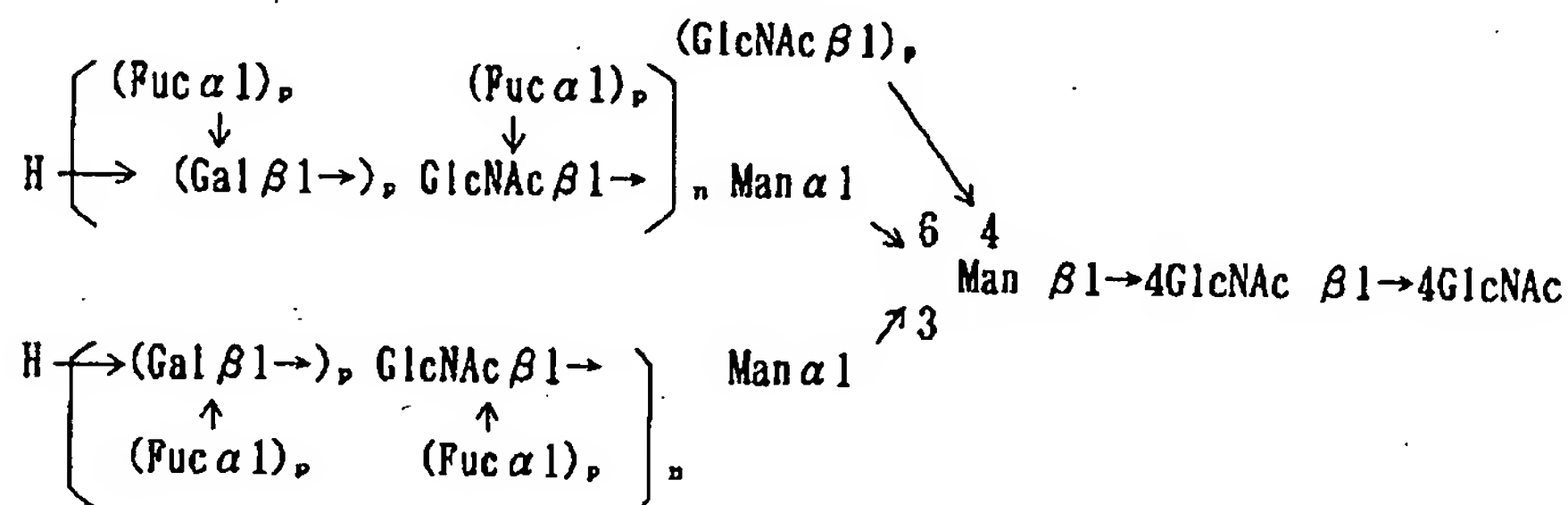
【化5】

(12)

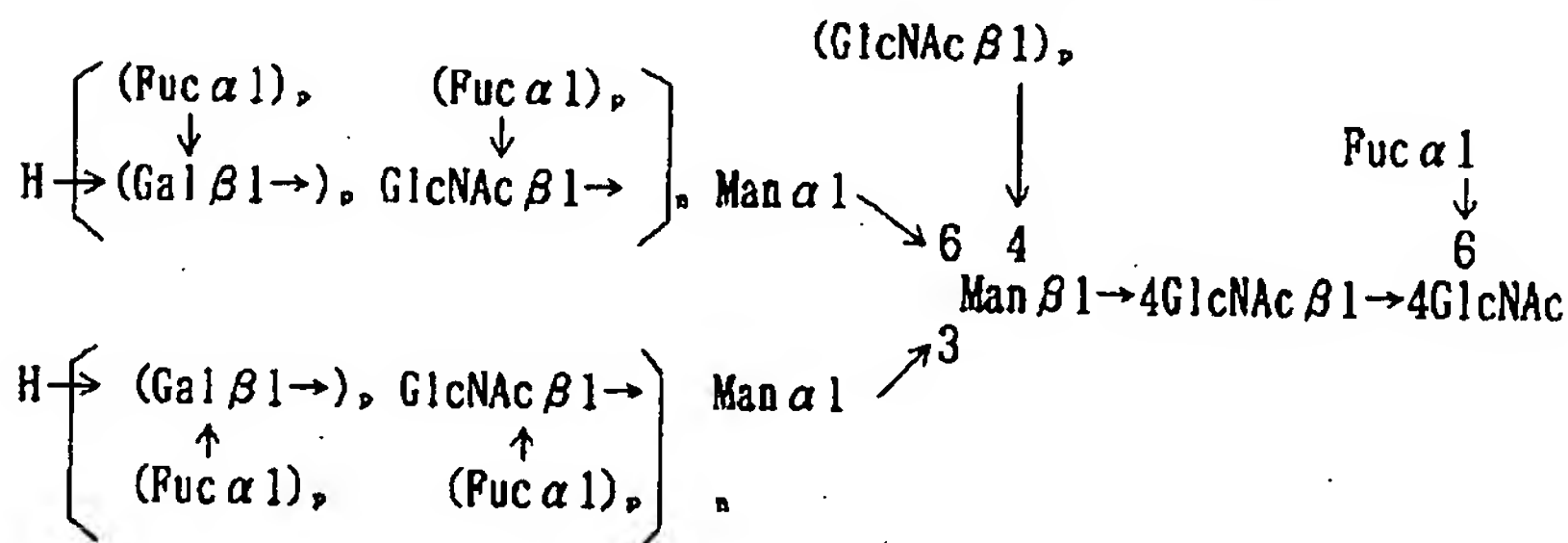
特開平7-126185



(kは1～5であり、pはそれぞれ独立に0又は1である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4GlcNAc  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4GlcNAc で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の 4GlcNAc  $\beta$ 1  $\rightarrow$  4GlcNAc で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正内容】

【0031】他方、クロロホルム/メタノール(1:1体積比)混合液にDPPEを5mg/mlの濃度で溶解してDPPE溶液を調製した。また、メタノールに、N, B H<sub>2</sub>CNを10mg/mlの濃度に溶解してN, B H<sub>2</sub>CN溶液を調製した。前記オリゴ糖溶液600μlに前記D

PPE溶液9.4ml及び前記N, B H<sub>2</sub>CN溶液1mlを加えて攪拌混合した。この反応混合液を60℃にて16時間インキュベートし、人工糖脂質を生成せしめた。この反応混合液をシリカゲルカラム及びC18逆相カラムにより精製することにより人工糖脂質を得た。尚、マンナンコレステロール(同仁化学)は市販品を使用した。

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

(13)

特開平7-126185

## 【補正内容】

【0035】リボソームの表面に付加すべきオリゴ糖がM5又はRN、あるいはマンナン(Mn)(比較例)の場合には、これらから調製した人工糖脂質を2~10mg/mlの濃度にPBSに溶解し、この溶液と上に調製したリボソームとを5:1の体積比で混合し、この混合物を室温で3日間インキュベートすることにより、オリゴ糖をリボソーム表面に吸着させた。未吸着の糖を測定することにより被覆された糖脂質の量を求めた。なお全てのリボソームの修飾は糖脂質で行ったが、簡便のため“M5”あるいは“マンナン”という具合に糖のみで記述してある。

## 【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0042】なお、マンノース、ラクトース又はガラクトースとDPPEの結合体には有意な活性は認められなかった(データは示さず)。以上の結果から、少なくとも2~11の糖残基よりなるオリゴマンノース等のオリゴ糖とDPPEの結合体には、リボソームに添加ないしリボソームを被覆することで、リボソームによるDTH

反応誘導能を促進する効果のあることが分かった。また、マンナンにも同様の効果のあることから、オリゴマンノースの長さは、これ以上長くても効果のあることが分かる。

## 【手続補正8】

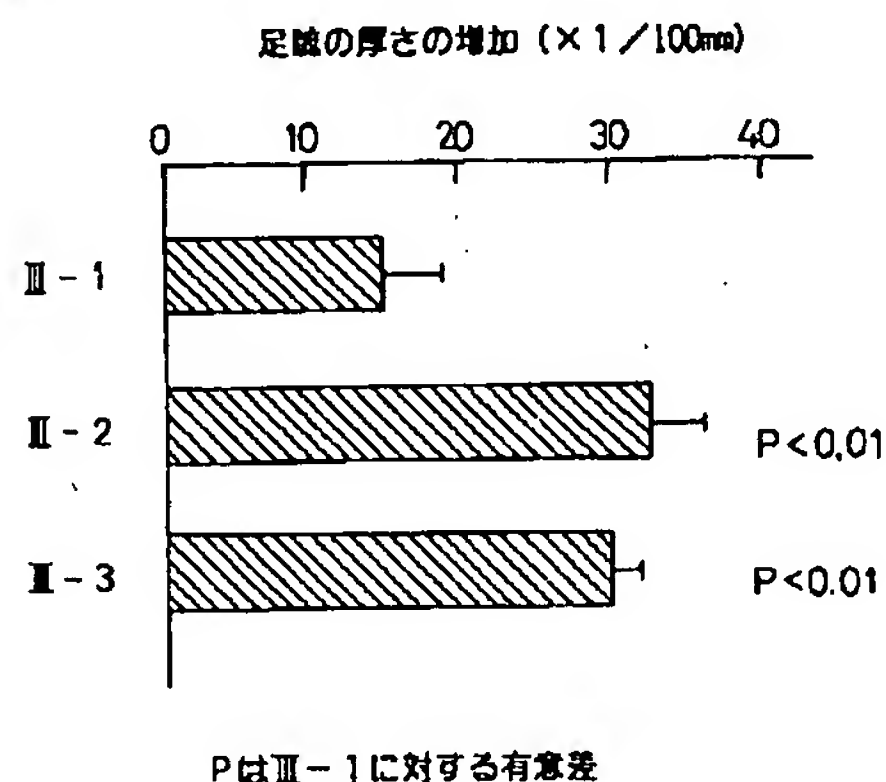
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【図1】



フロントページの続き

(74)上記2名の代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)

(72)発明者 杉本 正信  
埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内

(72)発明者 大石 和恵  
埼玉県入間郡大井町西鶴ヶ岡1丁目3番1号 東燃株式会社総合研究所内  
(72)発明者 畑中 正一  
京都府京都市左京区高野東開町1-23 東大路高野第三住宅35-203  
(72)発明者 水落 次男  
愛知県名古屋市昭和区滝川町26-1-B-110